

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED 03  
04 DEC 2003  
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年10月24日

出願番号  
Application Number: 特願2002-310090  
[ST. 10/C]: [JP2002-310090]

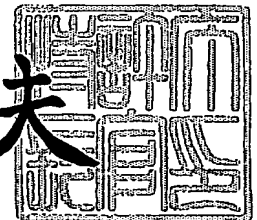
出願人  
Applicant(s): 株式会社 エフェクター細胞研究所  
松島 網治

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 SP0052SSK

【提出日】 平成14年10月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00  
C07K 14/00

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県松戸市松戸 159-1 第3住宅2-905

【氏名】 松島綱治

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区小石川 2丁目 9-12-201

【氏名】 米山博之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区後楽 1丁目 5-3 後楽寮 209号室

【氏名】 張 雁云

【特許出願人】

【識別番号】 500201406

【氏名又は名称】 株式会社エフェクター細胞研究所

【特許出願人】

【識別番号】 502060843

【氏名又は名称】 松島綱治

【代理人】

【識別番号】 100082739

【弁理士】

【氏名又は名称】 成瀬 勝夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100083080

【弁理士】

【氏名又は名称】 平田 克文

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011970

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【包括委任状番号】 0202868

【包括委任状番号】 0202873

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストを有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 2】 レセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニストを有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 3】 アゴニストが MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3、MCP-4 又はそれ等の機能的誘導体から選ばれる請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 4】 MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref) 又はこれらの機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 5】 MIP-1 $\alpha$  又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 6】 MIP-1 $\alpha$  の機能的誘導体が BB-10010 である請求項 5 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【請求項 7】 MIP-1 $\alpha$  を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫応答において重要な役割を果たす樹状細胞の血中レベル上昇剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

樹状細胞(dendritic cells; DCと略記する場合がある)は、幹細胞であるCD34<sup>+</sup>細胞から分化し、樹枝状の突起を持つという形態的特徴を有し、生体内において広く分布しており、生体内trafficking能力(移動能力)により、抗原の摂取とT細胞への抗原提示を効率よく行う細胞であることが知られている。即ち、樹状細胞

胞は、他の免疫担当細胞と同様に骨髄幹細胞に由来し、増殖分化・成熟の過程で分布する組織や器官を変えつつ、免疫監視細胞としての役割を果たしている細胞である。

### 【0003】

樹状細胞の増殖分化・成熟の過程は次の5段階に分けることができる。即ち、(1) 祖細胞期(DC progenitor)：主に骨髄に存在し、自己複製しながら前駆細胞を産生する。(2) 前駆細胞期(DC precursor)：定常状態で骨髄から血行性に生体の臓器にコンスタントに供給され、各臓器の血管壁を越えて組織内に入り上皮内や間質に分布する。(3) 見張り番期(sentinel DC)：樹状細胞はこのステージでは貪食能を持ち、分布した各臓器内に侵入してくる抗原を摂取する。表皮のlangerhans細胞、気道上皮の樹状細胞、心・肝など実質臓器のinterstitial DCなどがこの代表である。(4) 抗原輸送期(antigen-transporting DC)：樹状細胞は抗原情報を取り込むことにより一段階成熟して遊走能を獲得する。ヒト扁桃の場合は樹状細胞は陰窩上皮からT細胞領域(濾胞間域)まで扁桃組織内を遊走し、そこで免疫応答を起こす。他の臓器では、樹状細胞の多くは輸入リンパ管に入り、リンパ行性に所属リンパ節へ遊走し、T細胞領域(傍皮質)へ集積する。(5) 抗原提示期(mature DC)：リンパ臓器に入った樹状細胞は最終段階にまで成熟する。そして、T細胞と細胞集塊(クラスター)を形成して抗原特異的T細胞を選び出し、抗原提示を行う。その後、樹状細胞はT細胞領域でアポトーシスにより一生を終えるといわれる(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002)参照)。

### 【0004】

末梢血から採取した樹状細胞(前駆体)を、in vitro で、例えばGM-CSF及びTNF $\alpha$ の存在下に増殖させた後、疾患抗原、例えば腫瘍細胞等の疾患抗原で刺激し、これを生体内に戻すことにより、疾患に対する免疫療法が増強されることが知られている。これは、樹状細胞による免疫療法、或いはワクチン療法と云われ、対象疾患としては、メラノーマ、腎ガン、前立腺ガン、白血病、転移性悪性腫瘍等多岐にわたり試みられている。この様に樹状細胞の治療への応用は広く注目されており、樹状細胞を使った免疫療法は腫瘍のみならず、感染、移植や

自己免疫の領域にも拡がろうとしている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上述の様に樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量を手に入れることは、in vitroでの増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。本発明はそのための技術的手段を提供することを目的とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

以前本発明者は、下記参考例1に示すように、マウスに *Propionibacterium acnes*（以下P. acnesと云う）の死菌を投与することにより、樹状細胞前駆体（F4/80抗原陰性、B220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞）が血液中に誘導されることを見出した。その後の研究により、この樹状細胞前駆体誘導作用は抗MIP-1 $\alpha$ 抗体により抑制されることを見出し、樹状細胞前駆体の誘導メカニズムにMIP-1 $\alpha$  延いては未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストが関与しているとの推定をするに至り、更に研究を進め、生体外からMIP-1 $\alpha$ を投与することにより血中に存在する樹状細胞前駆体の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するという予想外の現象を発見し、本発明をなすに至った。なお、本件明細書の記述において、特段の断りがない限り、「樹状細胞」なる用語は、その様々な成熟段階にあるものの総称として用いられる。

#### 【0007】

ここに、本発明は、（1）未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストを有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、（2）レセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニストを有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、（3）アゴニストがMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3、MCP-4又はそれ等の機能的誘導体から選ばれる（2）記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、（4）MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)

)又はこれらの機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、(5) MIP-1 $\alpha$ 又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、(6) MIP-1 $\alpha$ の機能的誘導体がBB-10010である(5)記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、(7) MIP-1 $\alpha$ を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

未熟樹状細胞において発現しているレセプターとして、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR11及びCXCR4が知られている(細胞工学 Vol. 19, 1304-1310(2000))。これ等のレセプターに対するリガンドとして、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、TARC、MDC、MIP-3 $\alpha$ 、MIP-3 $\beta$ 、LARC、TECK、BLC、SDF-1、Exodus-1、Exodus-2その他が知られている(上記文献)。中でも、CCR-1及びCCR-5に共通するリガンドとしてMIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC及びLCC-1(ref)が知られている。MIP-1 $\alpha$ を用いた研究の結果から、これ等レセプターに対するリガンド、就中、アゴニストが樹状細胞前駆体の血中濃度レベルを上昇させる作用があることが期待される。

#### 【0009】

本発明における有効成分の代表例であるMIP-1 $\alpha$ はCCサブファミリーに属するケモカインとして知られており、レセプターCCR-1やCCR-5のリガンド(アゴニスト)である。ヒト成熟型MIP-1 $\alpha$ は70のアミノ酸よりなるとされているが、CD8<sup>+</sup>T細胞やHTLV-1感染細胞MT4培養上清から得られるものは66アミノ酸を有することが知られている。ヒトMIP-1 $\alpha$ には、個人により遺伝子コピー数の異なる非対立遺伝子LD78 $\beta$ が存在し、70アミノ酸型MIP-1 $\alpha$ とは配列が3残基異なるものが知られている。これ等は何れも本発明において使用できる。

#### 【0010】

本発明で使用できるMIP-1 $\alpha$ 機能的誘導体とは、MIP-1 $\alpha$ の誘導体であって、MIP-1 $\alpha$ と同様の生物活性を示すものであり、例えばBB-10010(European Journal of Cancer, Vol. 14, pp. 1023-1029(1998))を挙げることができる。

#### 【0011】

本発明に関わる樹状細胞の血中レベル上昇剤は、有効成分であるリガンド、即ちタンパク質を非経口的に投与するのが好ましく、例えば、水、若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る液体との無菌性溶液又は懸濁液などの注射剤の形で投与されることが好ましい。注射の為の無菌組成物は注射用水のようなビヒクル、天然植物油などを用いて有効成分を溶解又は懸濁させるなどの通常の製剤手段に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、ヤシ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。

#### 【0012】

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトまたは哺乳動物対して投与することができる。本発明の有効成分の投与量は、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、非経口的に投与する場合の該有効成分の1回投与量は、投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、成人（体重60kgとして）に投与する場合、一回につき約0.01~10mg程度、好ましくは約0.1~5mg程度である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0013】

【参考例1】 *P. acnes*による血中への樹状細胞前駆体の誘導と抗MIP-1 $\alpha$ 抗体による誘導抑制

B6マウス（雌、8-10週齢、クレア社製）に*P. acnes*（1mg/匹；American Type



Culture Collection 118289) を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。P. acnes 投与の6時間前に、その内の一群に機能抑制活性を有する抗MIP-1 $\alpha$ 抗体(ヤギポリクローナル抗体; 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Genzyme/Techne社製)を尾静注した。陰性対照としてヤギIgG (Sigma-Aldrich社製)を同様に投与した。

#### 【0014】

P. acnes 投与の3日後に各マウスより採取したヘパリン採血液をナイコプレップ (Axis-Shield社製) で分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球をFITC標識抗CD11c抗体 (クローンHL3; ファーミンジェン社製) およびPE (フィコエリスリン) 標識抗B220抗体 (クローンRA3-6B2; ファーミンジェン社製) で4 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた後、フローサイトメーター (EPICS-Elite、コールター社製) によって解析した。B220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞を樹状細胞前駆体として、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を算出した。結果を図1に示す。図1において「PBS」は、対照としてPBSのみを投与した群の結果である。

#### 【0015】

P. acnes 投与により、非投与群に比べ末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合が劇的に上昇した。このことは血液中に樹状細胞前駆体が誘導されたことを示している。抗MIP-1 $\alpha$ 抗体の投与群では、P. acnes 投与による末梢血単核球における樹状細胞前駆体の出現頻度の上昇が、約半分に抑制されることが確認された。

#### 【0016】

##### 【参考例2】本発明で使用されたMIP-1 $\alpha$ の製法

ヒトMIP-1 $\alpha$ 遺伝子をPCR法により取得した。該ヒトMIP-1 $\alpha$ 遺伝子を発現シャトルベクターpNCM02に組み込み、大腸菌にて増幅した。該ヒトMIP-1 $\alpha$ 遺伝子発現ベクターをBrevibacillus choshinensis (B. choshinensis) HPD31S5に導入した。該ヒトMIP-1 $\alpha$ 遺伝子導入B. choshinensisを培養して、その上清を採取した。該培養上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後、遠心にて上清を分離して、さらに60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後遠心にて該沈殿物を回収した。該沈殿物をトリス塩酸バッフ

ァー (pH 8.0) に溶解し、該溶解物を陰イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 $\alpha$ を含む画分を集め、硫酸アンモニウムを加えて溶解した (終濃度1.5M)。該溶解物を疎水性クロマトグラフィー (RESOURCE PHE; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 $\alpha$ を含む画分 (非吸着画分) を集め、硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈殿を行った (終濃度60%飽和)。沈殿物をトリス塩酸バッファー (pH 8.0) に溶解し、該溶解物を再度陰イオン交換クロマトグラフィー (RESOURCE Q; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうちMIP-1 $\alpha$ を含む画分を集め、トリス塩を除く目的で20mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.5) に対して透析を行った。この処理により生じた沈殿を遠心することにより精製ヒトMIP-1 $\alpha$ を得た。これを凍結乾燥後PBSに溶解させ、以下の実験に用いた。

#### 【0017】

##### 【実施例1】 MIP-1 $\alpha$ のマウス血中への樹状細胞前駆体誘導活性

B6マウス (雌、8-10週齢、クレア社製) に参考例2の製法により得られた精製MIP-1 $\alpha$  (5  $\mu$ g/匹) を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。MIP-1 $\alpha$  投与の4, 8, 16, 24, 48, 72時間後に該マウスより採取したヘパリン採血液を参考例1と同様にフローサイトメーターによって解析して、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を算出した。

#### 【0018】

結果を図2に示す。図において□の折れ線グラフが示すように、MIP-1 $\alpha$  投与により、短時間のうちに末梢血単核球における樹状細胞前駆体(B220-CD11c<sup>+</sup>cells)の割合が劇的に上昇し、投与後8時間でピークに達し (12.45 %  $\pm$  0.49)、該ピークは24時間後まで持続した。MIP-1 $\alpha$  投与前 (図2の時間がゼロの時点) における樹状細胞前駆体の濃度が0.5乃至1%であったことから、12乃至24倍のオーダーで血中レベルが上昇したことが明らかである。

#### 【0019】

##### 【実施例2】 MIP-1 $\alpha$ によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体の機能解析

MIP-1 $\alpha$  によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体がP. acnes により誘

導された樹状細胞前駆体と同様の性状を有するかを解析する目的で以下の実験を行った。

#### 【0020】

##### <1>末梢血由来樹状細胞前駆体の調整

B6マウス（雌、8-10週齢、クレア社製）にP.acnes死菌（1 mg/匹）又は参考例2の製法で得られた精製MIP-1 $\alpha$ （5  $\mu$ g/匹）を尾静脈より投与した。P.acnes死菌投与後3日目あるいはMIP-1 $\alpha$ 投与後16時間目に該マウスより麻酔下にて心臓からヘパリン採血を行った（0.8 ml/匹）。該ヘパリン採血液をナイコプレップで分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球をFITC標識抗CD11c抗体およびPE標識抗B220抗体で4℃で30分反応させた後、セルソーター（EPICS-E lite、コールター社製）によりB220抗原陰性、CD11c抗原陽性細胞を分離した。該分離細胞をGM-CSF（4 ng/ml；Kirin Brewery社製）とIL-4（10 ng/ml；Genzyme/Thech社製）存在下で5日間培養したものを末梢血由来樹状細胞前駆体とした。

#### 【0021】

##### <2>骨髄由来樹状細胞前駆体の調整

B6マウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を採取した。該骨髄細胞をナイコプレップで分離して骨髄単核球を採取した。該骨髄単核球をシャーレで10-12時間培養し、非付着骨髄単核球を回収した。該非付着骨髄単核球を磁気ビーズ標識c-kit抗体と混合培養し、磁気細胞ソーター（MACS；MiltenyiBiotec社製）にてc-kit陽性細胞を分離した。該c-kit陽性細胞を2.5 x 10<sup>5</sup> cells/mlの濃度にて、SCF（須藤先生（Toray社）より供与）、Flt3L（Immunex社製）、GM-CSF（4 ng/ml）とIL-4（10 ng/ml）存在下で7-9日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。該c-kit陽性細胞を2.5 x 10<sup>5</sup> cells/mlの濃度にて、SCF（須藤先生（Toray社）より供与）、Flt3L（Immunex社製）、GM-CSF（4 ng/ml）とIL-4（10 ng/ml）存在下で7-9日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。

#### 【0022】

##### <3>樹状細胞前駆体の抗原感作

抗原となる癌細胞株の可溶化物は、癌細胞を凍結・溶解を3回繰り返すことに

より調製した。該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来) および該骨髓由来樹状細胞前駆体と該癌細胞株可溶化物を樹状細胞前駆体：癌細胞が1：3になるように混合し、20時間培養した。該癌細胞株可溶化物感作樹状細胞前駆体を回収し、マイトマイシンC (10  $\mu$ g/ml) にて処理を行った後、2回洗浄したものを抗原感作樹状細胞前駆体とした。

#### 【0023】

##### <4> 抗原感作樹状細胞前駆体によるTリンパ球増殖反応測定

B6マウス脾臓細胞より、磁気細胞ソーター (MACS; MiltenyiBiotec社製) を用いてCD3陽性Tリンパ球を調製した。該Tリンパ球と該抗原感作樹状細胞前駆体 (B16癌細胞株可溶化物で感作した骨髓由来樹状細胞前駆体) の比が1：20になるように混合し、IL-2、IL-7の存在下で24穴プレートにて培養した。該培養Tリンパ球を5日間培養後、2-3日おきに50%の培地を新鮮なものと交換することにより培養を継続した。7および14日目に該抗原感作樹状細胞前駆体を新たに加えることにより、該培養Tリンパ球の再感作を行った。培養21日目に該培養Tリンパ球を回収した。次いで96穴丸底培養プレート (Nunc社製) を用いて、該培養Tリンパ球をMMC処理したB16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合し、37 $^{\circ}$ Cで4-5日間培養した。培養後、5 mg/ml のMMT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶液を15  $\mu$ l/穴加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間培養した。培養後、各穴の550 nm の吸光度を測定することにより、該Tリンパ球の増殖を測定した。

#### 【0024】

結果を図3に示す。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体は、P. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体と同様に該培養Tリンパ球の増殖を増強した。一方、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみではこのような該培養Tリンパ球の

増殖の増強活性は認められなかった。

#### 【0025】

<5> マウスの腫瘍増殖における免疫の効果の検討

B6マウスのグループ (8匹/グループ) それぞれに、0日目、7日目の2回、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各1 x 10<sup>6</sup>/マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSを腹側の皮下に注入した。14日後に該マウスの腹側の皮下にB16 癌細胞 (2 x 10<sup>5</sup>/マウス) を接種した。接種後3日おきに、腫瘍の面積を測定し、腫瘍の増殖を判定した。同時にマウスの生存日数も観察した。

#### 【0026】

結果を図4に示す。B6マウスをB16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体により免疫することにより、皮下に接種したB16癌細胞の増殖が著明に抑制された。また50% (5/10) のマウスにおいては、腫瘍の消失が観察され、60日以上生存の延長が確認された。この効果は、P. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髄由来樹状細胞前駆体と同等であった。一方、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみで免疫したマウスは、癌接種後20日以内に全例が死亡した。

#### 【0027】

<6> 腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

上記<4>と同様の方法により、B6マウス脾臓細胞よりCD3陽性Tリンパ球を調製し、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合培養することにより培養Tリンパ球を調製した。96穴プレートに該培養Tリンパ球を連続希釈したものを100 $\mu$ l/穴ずつ加えた。次にB16 癌細胞株の細胞浮遊液を100 $\mu$ l/穴ずつ加えた。該プレートを37 $^{\circ}$ C、10時間培養した。該プレートを遠心後、上清100 $\mu$ l/

穴を新たな96穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で30分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて 490 nm の吸光度を測定した。

#### 【0028】

結果を図5に示す。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体と混合培養したTリンパ球は、効率的にB16癌細胞を傷害したが、EL4癌細胞は傷害しなかった。B16癌細胞株可溶化物で感作したP. acnes死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体で混合培養したTリンパ球も同様にB16癌細胞を傷害した。しかし一方、癌細胞株可溶化物のみと混合培養したTリンパ球は、B16癌細胞を傷害しなかった。

#### 【0029】

<7>上記<5>において、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来) あるいは該骨髓由来樹状細胞前駆体で免疫したB6マウスのうち、B16癌細胞株接種後60日目に癌細胞が消失していたものについて、該マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞のCD8陽性Tリンパ球を分離して ( $1 \times 10^6$ )、MMC処理したB16癌細胞株 ( $1 \times 10^5$ ) と5日間培養した。96穴プレートに該培養Tリンパ球を連続希釈したものを100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。次にB16癌細胞株の細胞浮遊液を100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。該プレートを37 $^{\circ}$ C、10時間培養した。該プレートを遠心後、上清100  $\mu$ l/穴を新たな96穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で30分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて 490 nm の吸光度を測定することにより細胞傷害活性を測定した。MHC classI 機能阻害実験の場合は、B16癌細胞を抗MHC classI抗体 (抗 H2Kb/H2Db 抗体) あるいはコントロール抗体 (抗 H2Dd 抗体) で添加前37 $^{\circ}$ C、30分間、処理した。

#### 【0030】

図6に結果を示す。該培養Tリンパ球は、効率的にB16癌細胞を傷害したが、EL4癌細胞は傷害しなかった。またこの活性は、該培養Tリンパ球を抗MHC classI抗

体で処理することにより完全に抑制された。しかしコントロール抗体では、このような効果はみられなかった。

#### 【0031】

<8> B6マウスに、0日目、7日目の2回、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P. acnes死菌あるいは精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、EL4癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各1 x 10<sup>6</sup>/マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSを腹側の皮下に免疫した。二回目の免疫後7日目に、該免疫マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞よりセルソーターを用いてCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞T細胞を分離した。該T細胞をMMC処理したB16癌細胞と混合し、24穴プレートを用いて48時間培養した。該培養細胞を用いて、細胞傷害活性を測定した。また該培養細胞の上清中のIFN $\gamma$ 濃度をIFN $\gamma$  ELISAシステム (エンドジェン社製) を用いて測定した。

#### 【0032】

<9> 肺転移における効果の確認

B6マウスの尾静脈よりB16癌細胞 (1 x 10<sup>6</sup>/マウス) を注入した。癌細胞注入後3日目、7日目に、B16癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来)、B16癌細胞株可溶化物で感作した該骨髄由来樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各1 x 10<sup>6</sup>/マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいはPBSをそれぞれ尾静脈より注入した。癌細胞注入後21日目にマウス肺を摘出して、癌転移巣の数を測定して転移の程度を判定した。

#### 【0033】

結果を図7に示す。データは、各グループ3匹のマウスの平均値で表している。B16癌細胞株可溶化物で感作した精製MIP-1 $\alpha$ 投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体および骨髄由来樹状細胞前駆体で癌接種後免疫を行ったマウスでは、B16癌細胞の肺への転移が劇的に抑制された。しかし混合培養したTリンパ球も同様にB16癌細胞を傷害した。しかし未感作該樹状細胞前駆体で免疫したマウスでは、このような転移抑制効果はみられなかった。

#### 【0034】

**【発明の効果】**

肝ではKupffer cellがMIP-1 $\alpha$ を産生すること、及びDC前駆細胞はそれに対応するレセプターCCR5を発現していることが報告されている(J. Exp. Med., 193:35-49(2001))。これらの事実に基づき、炎症が一度起これば、樹状細胞の前駆細胞が、免疫応答の必要性の有無に関わらず、好中球並みの速さで抗原の探査に駆けつけ、抗原が存在する場合は最短時間で免疫応答を惹起し、生体のリスクを減らすことになるとの推定がなされている(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002))。

**【0035】**

また、末梢血中には樹状細胞に分化する幹細胞であるCD34<sup>+</sup>細胞が存在し、これがMIP-1 $\alpha$ により動員されることも報告されている。更に、CD34<sup>+</sup>細胞をin vitroで培養し増殖させるためにMIP-1 $\alpha$ を用い得ることが知られている(USP 5922597(1999))。

**【0036】**

しかし、生体外から投与したMIP-1 $\alpha$ がDC前駆細胞の血中への動員に直接的に寄与することは知られておらず、しかも、血中に存在する樹状細胞前駆細胞の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するということは、本発明者等により初めて見出されたことである。

**【0037】**

更に、本発明により血中におけるレベルが上昇した樹状細胞前駆体が、生体内で十分なワクチン効果を奏することは実施例2において詳述した通りである。

**【0038】**

かくして本発明により、患者から十分な量の樹状細胞前駆体を採取することが可能となり、樹状細胞による免疫療法の実用化への道が拓かれたとすることができる。

**【0039】****【図面の簡単な説明】**

**【図1】** B6マウスへのP. acnes 投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導における、抗MIP-1 $\alpha$ 抗体の効果を示す。



【図 2】 B6マウスへのMIP-1 $\alpha$  投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導活性を経時的に示す。

【図 3】 MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を抗原感作したものとTリンパ球を共培養して行った混合リンパ球反応におけるTリンパ球の増殖の効果を示す。

【図 4】 マウスに接種した腫瘍細胞の増殖における、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の効果を示す。

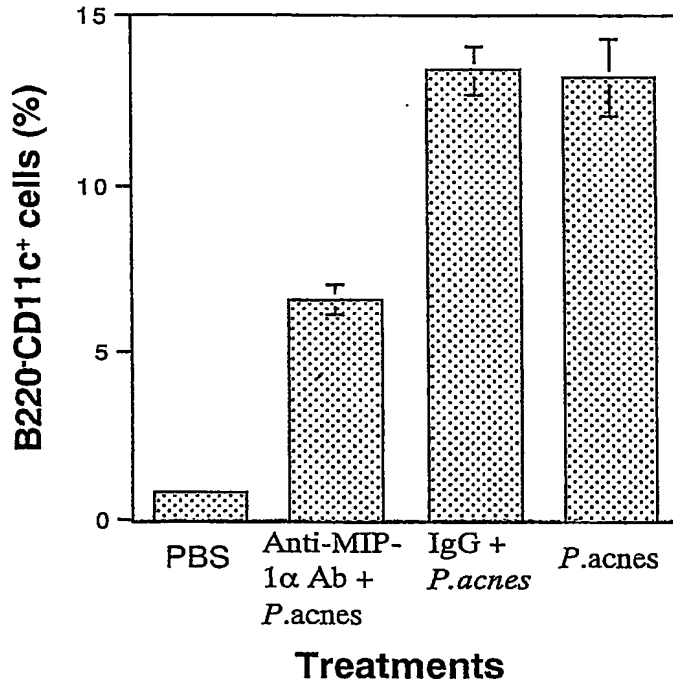
【図 5】 MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体の *in vitro*での腫瘍特異的な傷害T細胞の誘導における効果を示す。

【図 6】 MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体によって誘導された腫瘍特異的な傷害T細胞のMHC classI 拘束性の確認実験の結果を示す。

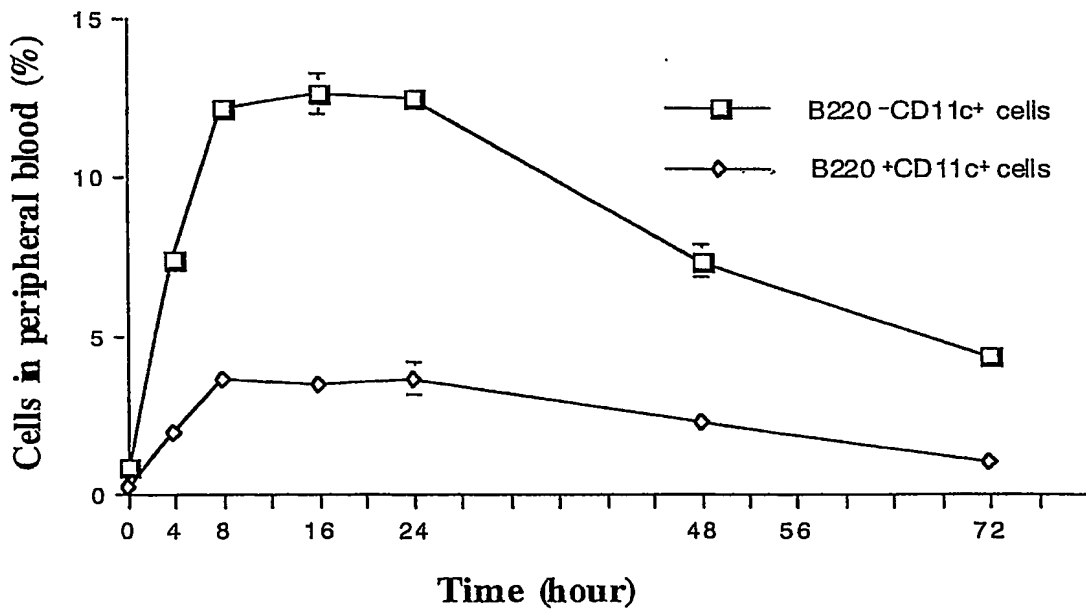
【図 7】 MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の腫瘍細胞のマウス肺転移における効果を示す。

【書類名】 図面

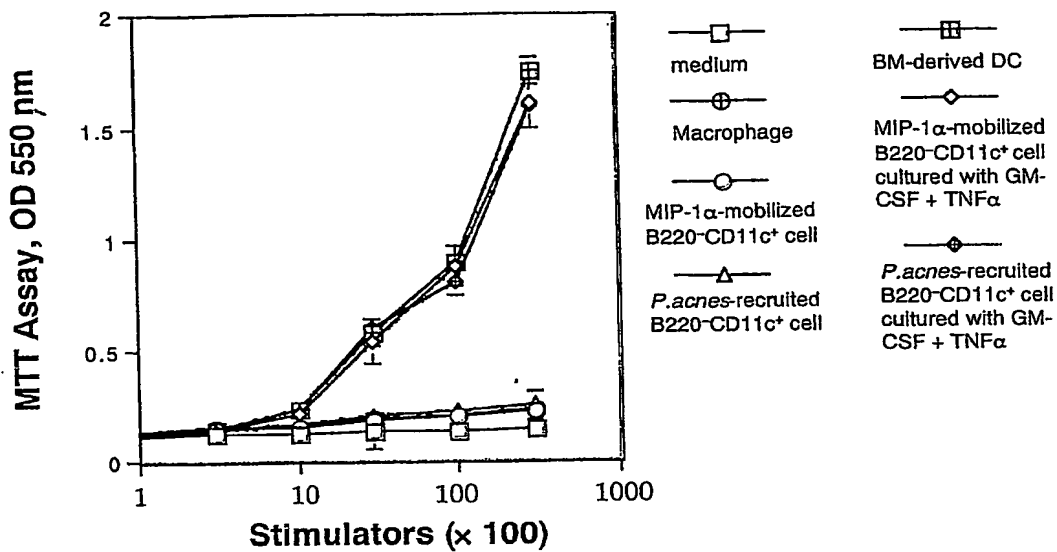
【図 1】



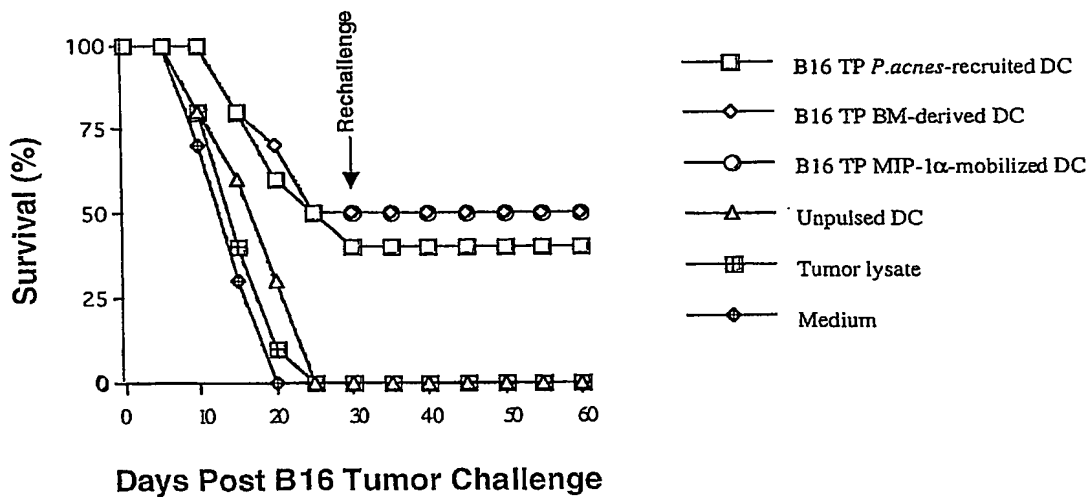
【図 2】



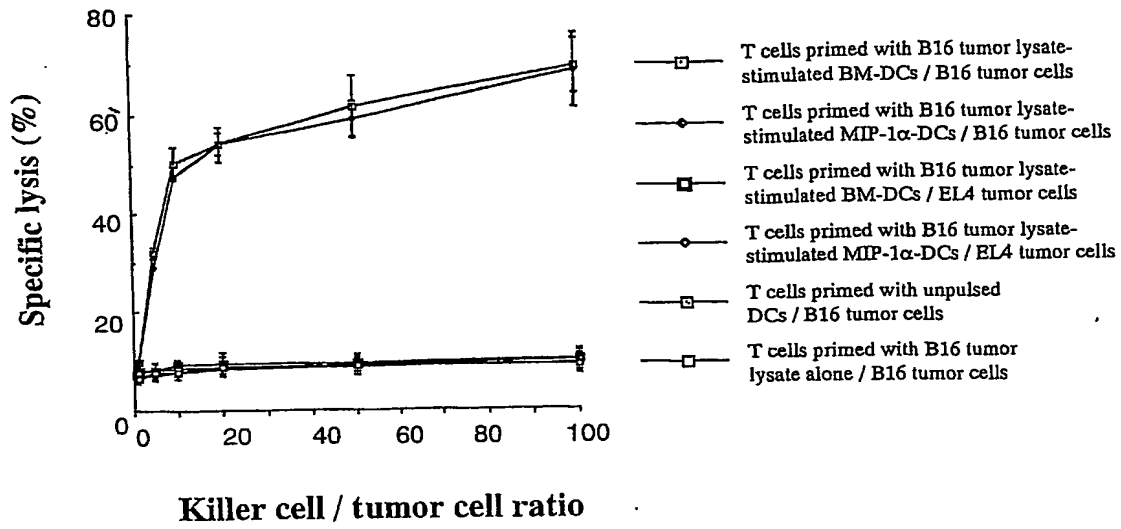
【図3】



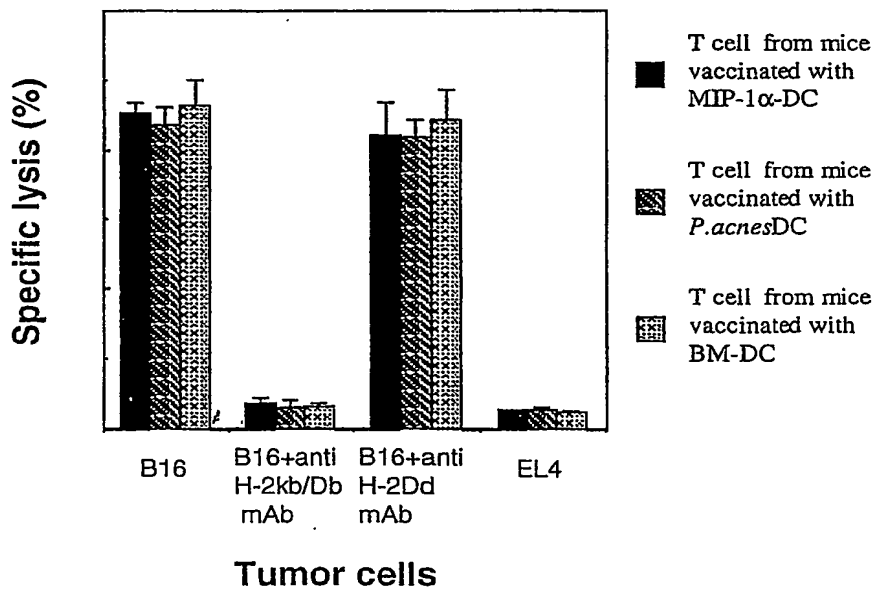
【図4】



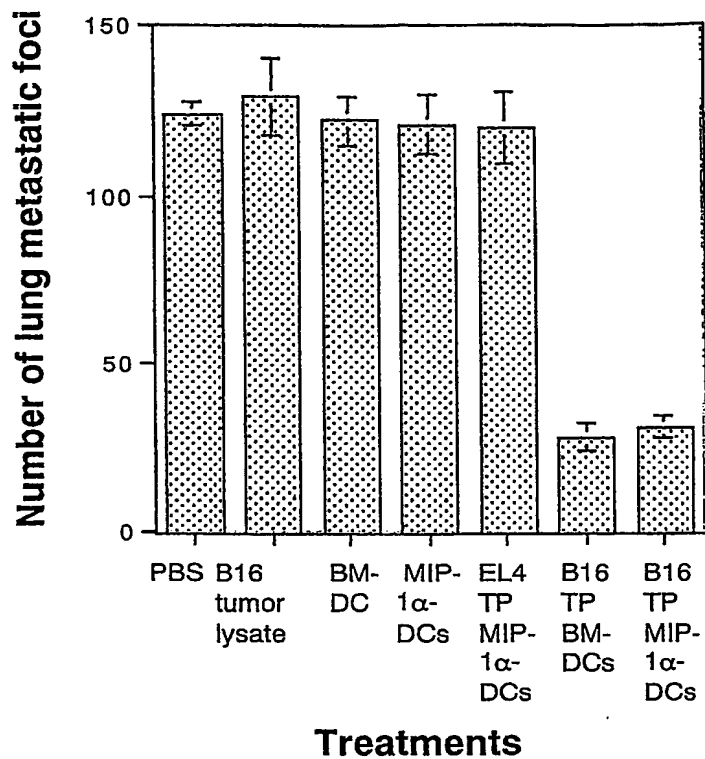
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量入手することは、in vitroでの増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。

【解決手段】 本発明は、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストを有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

【選択図】 図2

特願 2002-310090

出願人履歴情報

識別番号

[500201406]

1. 変更年月日

2000年 4月28日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都目黒区駒場4-6-2メゾン駒場401号

氏名

株式会社 エフェクター細胞研究所

特願 2002-310090

出願人履歷情報

識別番号

[502060843]

1. 変更年月日

2002年 2月19日

[変更理由]

新規登録

住所

千葉県松戸市松戸159-1 第3住宅2-905

氏名

松島 綱治